

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОВ mTERF В РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МИТОХОНДРИЯХ АРАБИДОПСИСА

А.И. Катышев, Н.Б. Катышева, И.В. Федосеева, Г.Б. Боровский

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, byacky78@mail.ru

Аннотация. Данная работа посвящена исследованию роли митохондриальных факторов терминации транскрипции mTERF в реализации генетических процессов в митохондриях растений. Молекулярно-биологический анализ гомозиготных, мутантных по отдельным генам mTERF линий арабидопсиса показал, что в ряде из них снижен уровень экспрессии митохондриальных генов, причем характер изменений экспрессии транскрибируемых различными митохондриальными РНК-полимеразами (RpoTnp и RpoTm) в разных мутантных линиях различен.

Ключевые слова: экспрессия митохондриального генома, РНК-полимераза, транскрипционные факторы, копияность митохондриального генома

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-917-920

Современные исследования регуляции экспрессии митохондриальных генов растений ограничены, в основном изучением, данного процесса на посттранскрипционном уровне с участием белков, содержащих в своей структуре пентатрикопептидные повторы (PPR-белки), а, собственно, на транскрипционном уровне – изучением роли отдельных РНК полимераз в экспрессии митохондриальных генов. Так, в митохондриях арабидопсиса функционируют 2 полимеразы фагового типа – RpoTm и RpoTnp, последняя из которых имеет двойную локализацию – в митохондриях и в хлоропластах. Показано, что, по крайней мере, в случае RpoTnp для осуществления ее функции необходимо наличие неких неизвестных белковых кофакторов [Kuhn et al., 2007, 2009; также в обзоре Liege, 2011]. В качестве таких потенциальных факторов предлагалось несколько различных кандидатов, включая гомологи бактериального сигма-фактора, отдельные PPR-белки, гомологи обнаруженных у животных митохондриальных транскрипционных факторов (mtTFA и mtTFB) и другие [Liege, 2011]. Достоверных данных, подтверждающих участие этих факторов в экспрессии митохондриальных генов растений, до сих пор не получено. В то же время в последние годы получены данные, показывающие важную роль в реализации генетических процессов в органеллах растений белков-гомологов митохондриального фактора терминации транскрипции (mTERF, рассмотрено в обзоре Klein, 2015), обнаруженного впервые у метазой. У арабидопсиса семейство генов mTERF состоит из 35 представителей. Все гены mTERF кодируют хлоропластные, митохондриальные или имеющие двойную локализацию белки. Гены mTERF на сегодняшний день являются наиболее вероятными кандидатами на роль генов, участвующих в регуляции транскрипции митохондриальных генов. Функция этих генов в реализации генетических процессов в митохондриях арабидопсиса, вероятно, различна. Так, Kuhn с соавторами в 2009 году показали, что в мутантных растениях по RpoTnp помимо снижения экспрессии специфичных для этой полимеразы генов наблюдается усиление экспрессии ряда других митохондриальных генов [Kuhn et al., 2009]. Авторы показали, что такое увеличение содержания транскриптов в митохондриях связано с увеличением копияности митохондриальной ДНК. Увеличение копияности мтДНК в мутантах по гену RpoTnp и соответствующее снижение ее до контрольного уровня в мутантах с компенсацией функции RpoTnp в митохондриях, но

не хлоропластах, показано также и в нашей работе [Tarasenko, 2016]. Эти данные позволяют предположить, что какие-то из интересующих нас mTERF, аналогично mTERF1 животных, могут участвовать также и в модуляции репликации мтДНК.

Целью данной работы является изучение вклада отдельных представителей семейства генов, кодирующих митохондриальные факторы терминации транскрипции (mTERF), в реализацию генетических процессов в митохондриях растений, а также возможное их участие в координации регуляции экспрессии хлоропластных и митохондриальных генов в онтогенезе. Для достижения поставленной цели предполагается использование линий растений арабидопсиса из коллекции семян Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), мутантных по генам mTERF. Для интересующих нас генов mTERF были заказаны мутантные линии из коллекции ABRC, для 2 генов (mTERF24 и mTERF34) не удалось заказать линии со встройкой T-ДНК в транскрибируемой области гена, были заказаны линии с соответствующей встройкой в промоторной области.

Поскольку встройка T-ДНК в промоторной области гена не обязательно может приводить к существенной дисфункции гена, для наименее изученного, но в то же время, согласно нашим предположениям, представляющего наибольший интерес гена mTERF34, было решено получить трансгенные растения арабидопсиса с повышенной и пониженной экспрессией этого гена. Для решения этой задачи были созданы генетические конструкции на основе плазмиды pBI121 с ориентацией кДНК гена mTERF34 в смысловой и антисмысловой ориентации под контролем 35S промотора. Эти конструкции были использованы для трансформации растений арабидопсиса методом окунания цветков, получены трансгенные растения, наличие встройки T-ДНК в которых подтверждено с помощью ПЦР. В итоге нами были впервые получены растения поколения T3 с повышенным и пониженным уровнем экспрессии интересующего нас гена mTERF34. В линии с наиболее высоким уровнем гиперэкспрессии интересующего нас гена количество транскрипта гена mTERF34 выше примерно в 65 раз, чем в контрольных растениях (рис. 1).



Рис. 1. Сравнительный анализ количества мРНК гена mTERF34 в контрольных растениях и растений с гиперэкспрессией этого гена.

Что касается мутантных растений, то на сегодняшний день с помощью ПЦР отобраны гомозиготные линии с мутацией 6 интересующих нас генов mTERF

(mTERF13, mTERF19, mTERF22, mTERF24, mTERF30, mTERF31), для еще двух генов получены только гетерозиготные линии, что, вероятно, связано с эмбриолетальным эффектом мутаций. Соответствие положения встройки Т-ДНК в нужном участке генома арабидопсиса подтверждено секвенированием.

Предварительный молекулярно-биологический анализ гомозиготных мутантных линий с помощью метода ПЦР в реальном времени показал, что в ряде из них снижен уровень экспрессии митохондриальных генов, причем характер изменений экспрессии транскрибируемых различными митохондриальными РНК-полимеразами (RpoT_{mp} и RpoT_m) в разных мутантных линиях различен. Так, в линиях растений, мутантных по генам mTERF19 и mTERF22, одинаково снижен уровень транскриптов генов, транскрибируемых обеими полимеразам. В линиях, мутантных по mTERF24 и mTERF30, достоверно снижен уровень мРНК генов, транскрибируемых RpoT_m, но не RpoT_{mp}. В линии, мутантной по гену mTERF13, наоборот, достоверно снижается количество мРНК генов, транскрибируемых RpoT_{mp}, но не RpoT_m. На рис. 2 представлены результаты одного из экспериментов по определению уровней экспрессии митохондриальных генов в мутантных линиях растений с помощью ПЦР-РВ.

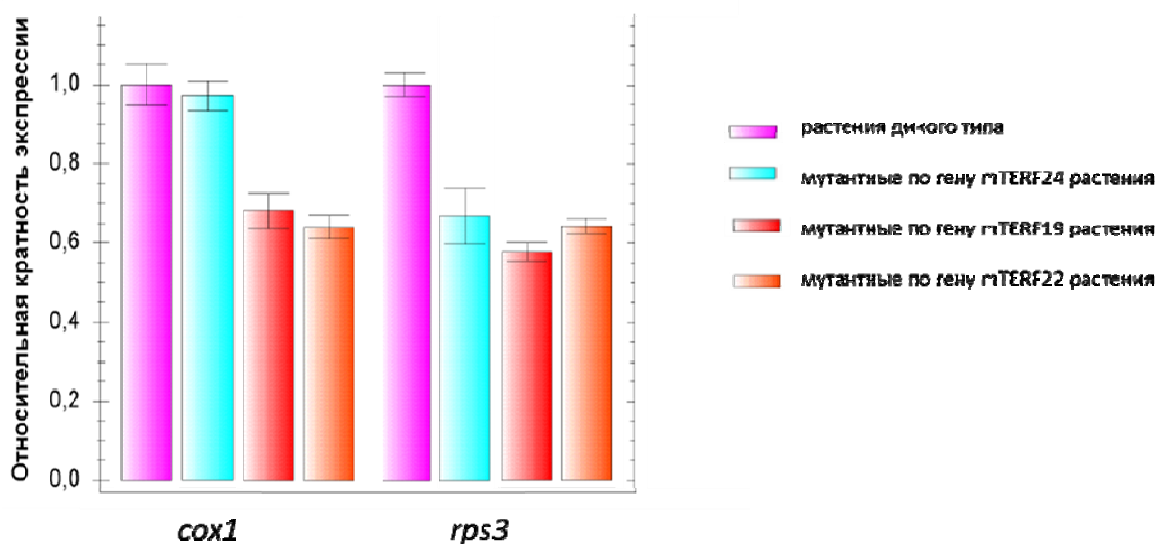


Рис. 2. Сравнительный анализ экспрессии митохондриальных генов в мутантных линиях растений. *cox1* – транскрибируемый RpoT_{mp} митохондриальный ген арабидопсиса, *rps3* – транскрибируемый RpoT_m митохондриальный ген арабидопсиса.

В данный момент нами проводится изучение возможной взаимосвязи наблюдаемых изменений экспрессии митохондриальных генов с копийностью митохондриальной ДНК, поскольку предполагается, что некоторые из генов mTERF в растениях, так же, как и у животных, могут участвовать в модуляции репликации ДНК митохондрий. Помимо этого в данный момент проводятся аналогичные исследования изменений экспрессии митохондриальных генов в трансгенных растениях с гипо- и гиперэкспрессией гена mTERF34. С целью изучения возможного участия исследуемых нами генов mTERF в координации регуляции экспрессии митохондриального и хлоропластного геномов исследуется также характер изменений количества транскриптов хлоропластных генов в растениях мутантных линий.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 17-04-01515.

Литература

Klein T., Leister D. Emerging functions of mammalian and plant mTERFs. (Review) // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2015 – V. 1847. – P. 786–797.

Kuhn K., Bohne A.V., Liere K., Weihe A., Börner T. Arabidopsis phage-type RNA polymerases: Accurate in vitro transcription of organellar genes // *Plant Cell*. – 2007. – V. 19. – P. 959–971.

Kuhn K., Richter U., Meyer E.H., Delannoy E., de Longevialle A.F., O'Toole N., Börner T., Millar A.H., Small I.D., Whelan J. Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell*. – 2009. – V. 21. – P. 2762–2779.

Liere K., Weihe A., Börner T. The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation // *Journal of Plant Physiology*. – 2011. – V. 168. – P. 1345–1360.

Tarasenko V.I., Katyshev A.I., Yakovleva T.V., Garnik E.Y., Chernikova V.V., Konstantinov Y.M., Koulintchenko M.V. RPOTmp, an Arabidopsis RNA polymerase with dual targeting, plays an important role in mitochondria, but not in chloroplasts // *Journal of Experimental Botany*. – 2016. – V. 67. – P. 5657–5669.

INVESTIGATION OF INDIVIDUAL MITOCHONDRIAL TRANSCRIPTION TERMINATION FACTORS (mTERFs) ROLE IN REALIZATION OF GENETIC PROCESSES IN ARABIDOPSIS MITOCHONDRIA

A.I. Katyshev, N.B. Katysheva, I.V. Fedoseeva, G.B. Borovskii

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, byacky78@mail.ru

Abstract. This work is devoted to the study of the role of mitochondrial transcription termination factors (mTERFs) in the implementation of genetic processes in plant mitochondria. Molecular-biological analysis of individual homozygous mTERF-mutant Arabidopsis lines showed that in some of them the level of expression of mitochondrial genes was reduced, and the profiles of the expression of transcribed by different mitochondrial RNA polymerases (RpoTmp and RpoTm) genes varied in individual mutant lines.

Keywords: *expression of the mitochondrial genome, RNA polymerase, transcription factors, the mitochondrial genome copy number*